

Best Available Copy

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003 年 12 月 18 日 (18.12.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/103721 A1

(51) 国際特許分類: A61K 48/00, 38/27, 9/06, 9/08, 9/107,
9/20, 9/28, 9/48, 31/711, A61P 9/00, 9/10, 25/28, 43/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP03/07004

(22) 国際出願日: 2003 年 6 月 3 日 (03.06.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ: 特願 2002-165437 2002 年 6 月 6 日 (06.06.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): アンジェ
ス エムジー株式会社 (ANGES MG, INC.) [JP/JP]; 〒
560-0082 大阪府 豊中市 新千里東町 1 丁目 4 番 2 号
Osaka (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 森下 竜一 (MOR-
ISHITA, Ryuichi) [JP/JP]; 〒560-0082 大阪府 豊中市 新
千里東町 1 丁目 4 番 2 号 千里ライフサイエンスセン
タービル 10 階 アンジェス エムジー株式会社内 Os-
aka (JP). 島村 宗尚 (SHIMAMURA, Munehisa) [JP/JP];
〒560-0082 大阪府 豊中市 新千里東町 1 丁目 4 番 2 号
千里ライフサイエンスセンタービル 10 階 アンジェ
ス エムジー株式会社内 Osaka (JP).

(74) 代理人: 清水 初志, 外 (SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒
300-0847 茨城県 土浦市 卸町 1-1-1 関鉄つくばビ
ル 6 階 Ibaraki (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO,
NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU,
ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ,
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,
GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

WO 03/103721 A1

(54) Title: GENE THERAPEUTIC FOR CEREBROVASCULAR DISORDERS

(54) 発明の名称: 脳血管障害遺伝子治療剤

(57) Abstract: It is intended to provide a novel method of treating cerebrovascular disorders which comprises overexpressing HGF by transferring an HGF gene. According to this method with the use of the HGF gene, cerebrovascular disorders such as brain infarction can be actively treated via gene transfer. Thus, it becomes possible to maintain nerve functions and inhibit infarction in a patient for whom no efficacious therapy has been established so far.

(57) 要約: 本発明により、HGF 遺伝子の導入による HGF の過剰発現という、新しい脳血管障害の治療法が提供された。本発明の HGF 遺伝子を使用した方法により、脳梗塞等の脳血管障害に対して積極的な遺伝子導入による治療を行うことができ、従来、適切な治療法のなかった患者において神経機能の維持、梗塞巣の抑制が可能となる。

- 1 -

明細書

脳血管障害遺伝子治療剤

技術分野

本発明は、肝細胞増殖因子(hepatocyte growth factor:HGF)遺伝子を用いた脳血管障害の治療または予防に関する。より詳細には、HGF 遺伝子を有効成分として含有する治療剤または予防剤、及び該治療剤または予防剤を標的部位へ投与することを特徴とする方法に関する。

背景技術

肝細胞増殖因子(HGF)は、肝実質細胞を*in vitro*において増殖させる因子として見出されたサイトカインである (Biochem.Biophys.Res.Comm.122: 1450 (1984); Proc. Natl.Acad.Sci.USA 83: 6489 (1986); FEBS Letters 22: 231 (1987); Nature 342: 440-443 (1989); Proc.Natl.Acad.Sci. USA 87: 3200 (1991))。HGFはプラスミノゲン関連及び間充織由来多面的成長因子であり、多様な細胞において細胞成長と細胞運動性を調節することが知られている (Nature 342: 440-443 (1989); Biochem.Biophys.Res.Comm. 239: 639-644 (1997); J.Biochem.Tokyo 119: 591-600 (1996))。さらに、胚新生及び幾つかの器官においては再生における形態形成工程を調節する重要な因子であることも知られている (Exp.Cell Res. 196: 114-120 (1991); Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90: 1937-1941 (1993); Gene Therapy 7: 417-427 (2000))。さらに、HGFは*in vivo*において肝再生因子として障害肝の修復・再生に寄与するだけでなく、血管新生作用を有し、虚血性疾患や動脈疾患の治療または予防に大きな役割を果たし得ることが明らかにされている (Symp.Soc.Exp.Biol.47 cell behavior 227-234 (1993); Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90: 1937-1941 (1993);Circulation 97: 381-390 (1998))。

8))。

以上のように、HGF は血管新生因子の機能をはじめとし、種々の機能を示すことから、医薬品として活用するための様々な試みがなされてきた (実験医学(増刊)10(3): 330-339 (1992))。HGF には、たとえば、次に示すような用途が報告されている。

抗ガン剤(特開平 6-25010 号公報)、
肺傷害治療剤(特開平 6-172207 号公報)、
ガン治療副作用軽減剤(特開平 6-340546 号公報)、
上皮細胞増殖促進剤 (特開平 7-179356 号公報)、
免疫抑制剤副作用軽減剤(特開平 7-258111 号公報)、
劇症肝炎治療剤(特開平 10-167982 号公報)、
心筋梗塞治療剤(特開平 11-246433 号公報)、
動脈疾患治療剤(特開平 8-295634 号公報)、
肥満症治療剤(特開平 10-279500 号公報)、
拡張型心筋症治療剤 (特開平 11-1439 号公報)、
筋萎縮性側索硬化症治療剤 (特開 2002-87983 号公報)、
肺線維症予防剤(特開平 8-268906 号公報)、
軟骨障害治療剤(特開平 8-59502 号公報)、
コラーゲン分解促進剤(特開平 7-300426 号公報)、
胃・十二指腸疾患治療剤 (特開平 7-138183 号公報)、
脳神経障害治療剤 (特開平 7-89869 号公報)、
急性腎不全治療剤 (特表 2001-516358 号公報)、
虚血性疾患/動脈疾患治療剤(WO00/07615 号)、
糖尿病治療剤(WO98/32458 号)、
毛髪用外用剤(特開平 5-213721 号公報)、
皮膚化粧品(特開平 5-213733 号公報)、

育毛促進剤(特開平 5-279230 号公報)、

巨核球増加剤(特開平 7-101876 号公報)、

分化誘導剤(特開 2002-78482 号公報)、

腎糸球体疾患治療剤(特開平 9-87199 号公報)、

悪液質治療剤(特開平 10-316584 号公報)、

多臓器不全治療剤(特開平 10-310535 号公報)、

虚血性疾患治療剤(WO96/32960 号)、

細胞増殖・分化剤(特表平 10-503923 号公報)、

造血細胞増殖分化剤(特表平 10-509951 号公報)、

神経障害改善薬(特開平 7-41429 号公報)、および

低血糖症・グリコーゲン病治療剤(特開平 10-7586 号公報)

タンパク性製剤を用いる場合、静脈内への投与が一般的である。虚血性疾患モデルに対する HGF の投与では静脈や動脈内への投与が例示されている (Circulation 97: 381-390 (1998))。このような動物モデルでの静脈または動脈内投与による HGF の有効性は明らかにされているものの、具体的な疾患における HGF の有効な投与方法及び投与量等については未だ結論が得られていない。特に、HGF タンパク質の医薬品としての活用において問題となったのは、その血中における半減期の短さである。HGF の血中半減期は 10 分と短く、その機能を十分に発揮するような血中濃度を維持することが困難であった。また、有効量の HGF を患部へどのように運搬するのかという課題も指摘されている。

分子生物学の分野における技術の飛躍的な向上により、遺伝子を細胞内へ導入する遺伝子治療が可能となった。一般に遺伝子治療は多様な医学的処置において使用することができる (Science 256: 808-813 (1992) ; Anal.Biochem. 162: 156-159 (1987))。遺伝子治療を成功させる上で特に重要なのは、遺伝子導入のための適当なベクターを選択することである。従来、アデノウイルス等のウイルス起源ベクターの遺伝子導入における使用が提案されてきている。

しかしながら、次のようなウイルスベクターの潜在的な危険性も指摘されている。

ウイルスの有する感染毒性、

宿主の免疫機能低下に伴うウイルスの病原性の発現、及び

ウイルスの突然変異性または発ガン性等

ウイルスベクターに代わる方法として、リポソームをウイルス外膜と共に利用する *in vivo* 遺伝子導入方法、あるいは HVJ-リポソーム媒介遺伝子導入法が開発されている (Science 243:375-378(1989) ; Anal.NY Acad.Sci. 772: 126-139 (1995))。既に、該方法を用いて肝臓、腎臓、血管壁、心臓及び脳を含む種々の組織への *in vivo* での遺伝子導入が成功している (Gene Therapy 7: 417-427 (2000) ; Science 243: 375-378 (1989) ; Biochem.Biophys.Res.Comm. 186: 129-134 (1992) ; Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90: 8474-8478 (1993) ; Am.J.Physiol. 271 (Regulatory Integrative Comp. Physiol.40): R1212-R1220 (1996))。

ところが、HVJ-リポソーム法においては、ウイルス及びリポソームという異なるビヒクルが必須であり、準備が複雑である。また、HVJ をリポソームと融合することによってウイルス粒子よりも平均直径が 1.3 倍大きくなる。その結果、細胞との融合活性が野生型ウイルスの 10%以下に減少すること、遺伝子導入が不可能な組織、導入効率の悪い組織が存在することが知られている。そこで、より安全で高効率な遺伝子治療を可能にする方法として、ウイルスエンベロープベクターを用いた遺伝子導入法が開発されている(特願 2001-026185/特開 2001-286282)。該方法では、ウイルス蛋白質の複製がない不活性化ウイルスをウイルスエンベロープとし、その中へ遺伝子を封入することにより、培養細胞、生体組織等への遺伝子導入ベクターとして用いることができる。このようなウイルスエンベロープベクターを使用することにより、肝臓、骨格筋、子宮、脳、眼部、頸動脈、皮膚、血管、肺、心臓、腎臓、脾臓、癌組織、神経、B リンパ球、呼吸器官の組織、浮遊細胞等に安全、且つ高効率に遺伝子を導入できることが知られている。

さて脳梗塞や脳内出血に代表される脳血管疾患は、社会的にも重要な疾患である。脳血管疾患による死亡率は近年低下してきてはいるものの、依然としてその死因における順位は高い。また、虚血性脳血管障害による後遺症を持つ有病者、医療機関に入院または通院する受療者は依然として増えつづけている。

一般に、脳動脈や頸部動脈における閉塞または灌流圧の低下による虚血性病変により脳組織が不可逆的に壊死に陥っている状態を脳梗塞という。脳梗塞は、大きく以下の3つの種類に分類される（曲直部寿夫、尾前照雄監修『脳血管障害』ライフサイエンス出版、p54-55（1992）；井村裕夫ら編『最新内科学大系第66巻 脳血管障害』中山書店、p28（1996））。

- (1)脳動脈の硬化性病変を基盤として、血液粘度の上昇及び灌流圧低下等により動脈閉塞を起こした結果、脳組織が虚血性壊死状態となる脳血栓症、
- (2)心内血栓や、稀ではあるが剥離した動脈壁血栓により脳動脈の塞栓が生じた状態である脳塞栓症、及び
- (3)頭部や頭蓋内脳動脈の狭窄または閉塞により末梢部の脳組織への血流が減少することにより生じる血行力学的梗塞

脳梗塞においては、脳浮腫が発症から数時間後に出現し、発症後1週間前後までこの状態が続く。その後、浮腫は次第に減少するが、発症後1ヶ月から3ヶ月の間に梗塞巣病変として固定する。脳浮腫は脳の容量増大を引き起こす。脳は固い頭蓋に被われているため、脳浮腫によって脳の容量がある限度を超えると、急激な組織圧及び頭蓋圧を生じることとなる。その結果、脳障害が悪化し、その後の梗塞巣病変の範囲が決定される（稲村憲治、赫彰郎『日本臨床第51巻 CT,MRI時代の脳卒中学 上巻』日本臨床、p231-239（1993））。脳の一部で梗塞が起こることにより、その領域が担っていた認知、知覚、感覚、記憶等の機能が失われる。

従来、神経細胞は虚血に対して弱いことが臨床的に認識されている。神経細胞によってはわずか数分間虚血状態に置かれただけで障害を受け、細胞死に至る。虚血状態の海馬体・錐体細胞では、脱分極に伴う顕著な神経興奮の後、伝導プロ

ックが起こる。その後、細胞外グルタミン酸、細胞内カルシウムイオン、及びフリーラジカル等の増加に伴う細胞毒性により細胞機能が失われ、細胞死に至るとされている。このような虚血による不可逆的変化は、急性期において適切な治療を行うことにより、死亡率の改善や後遺症の軽減が可能と考えられる。現在、脳梗塞に対する治療法として抗血小板薬、脳循環代謝改善薬等の投与が行われている。抗血小板薬の中には脳血栓急性期の治療に有効な薬剤も存在はするが、類似の症状を示す脳出血患者及び脳塞栓患者では出血性脳梗塞を助長することから禁忌であり、その使用に当たっては慎重に病型を診断する必要がある。

脳梗塞発作から約 1 ヶ月以降の慢性期に投与される脳循環改善薬は、急性期での使用が好ましくないと考えられている(亀山正邦編『脳卒中治療マニュアル』医学書院、p172-173 (1991))。その他の治療法として、発症後の超急性期において、細胞死に到っていない領域の血流を再開させるため、血栓溶解療法、バイパス術、血栓内膜剥離術、塞栓摘出術のような再灌流療法が行われている。しかしながら、脳梗塞において脳組織が既に不可逆的損傷を受けている場合には、その後の血行再開は出血性梗塞及び脳浮腫の増加等の組織障害が増幅される恐れもあり問題となっている(岡田靖、『神経研究の進歩』第 40 巻第 4 号第 655-665 頁、医学書院、(1996); 高橋明『medicina』第 32 巻第 11 号第 2261-2263 頁、医学書院、(1991))。

現在、脳梗塞急性期に使用される薬剤は、出血性梗塞及び虚血再灌流障害を起こす危険性を有している。また、対象となる病態及び治療効果が期待できる投与時期が限られている等の問題もあり、十分に満足できるものではない。

発明の開示

本発明の課題は、脳血流遮断後の再灌流に伴う脳虚血再灌流障害による脳に対する障害の程度を小さくすることができる薬剤の提供である。HGF 遺伝子は、VEGF 等の他の血管新生因子と異なり新生した血管の透過性亢進をもたらさない。特に脳血管障害では血管透過性の亢進により、脳浮腫や脳内圧亢進による脳組織

への障害が危惧されるため、血管の透過性亢進をもたらさない HGF を用いた治療及び予防方法は他の血管新生因子を用いた場合と比べて有利である。

本発明の目的は、HGF 遺伝子を用いた脳血管障害に対する治療剤または予防剤、及び該薬剤を用いた脳血管障害の治療法及び予防法を提供することである。即ち、本発明の要旨は以下の通りである。

- (1) HGF 遺伝子を含有する、脳血管障害の治療剤又は予防剤。
 - (2) 脳血管障害が脳梗塞である、(1) 記載の治療剤または予防剤。
 - (3) 該治療剤又は予防剤が錠剤、丸剤、糖衣剤、カプセル、液剤、ゲル剤、軟膏、シロップ、スラリー、懸濁物の形態である、上記 (1) または (2) の治療剤又は予防剤。
 - (4) 遺伝子をウイルス-エンベロープ法、内包型リポソーム法、静電気型リポソーム法、HVJ-リポソーム法、改良型 HVJ-リポソーム法、レセプター介在性遺伝子導入法、パーティクルガンで担体と共に核酸分子を細胞に移入する方法、naked-DNA による直接導入法、若しくは正電荷ポリマーによる導入法のいずれかにより細胞に移入するための、(1) ~ (3) いずれかに記載の治療剤または予防剤。
 - (5) 遺伝子を HVJ-エンベロープ法により細胞に移入するための、(1) ~ (3) いずれかに記載の治療剤または予防剤。
 - (6) HGF 遺伝子を哺乳動物に導入する工程を含む、脳血管障害の治療または予防法。
 - (7) 脳血管障害が脳梗塞である、(6) 記載の治療または予防法。
 - (8) HGF 遺伝子を HVJ-エンベロープ法により 2~3 回哺乳動物に導入することを含む、(6) または (7) 記載の治療または予防法。
 - (9) 脳血管障害の治療剤または予防剤の製造のための HGF 遺伝子の使用。
 - (10) 脳血管障害が脳梗塞である、(9) 記載の HGF 遺伝子の使用。
- 本発明において使用する「HGF 遺伝子」とは、HGF(HGF タンパク質)を発現

可能な核酸分子を指す。ここで、核酸分子とは、DNA、RNA、cDNA、mRNA等の核酸分子を指す。具体的には、HGFをコードするcDNAは、例えばNature 342: 440 (1989)、特許第 2777678 号公報、Biochem.Biophys.Res.Comm. 163:967 (1989)等に記載されている。HGFをコードするcDNAの塩基配列は前記文献に記載されている他、GenBank等のデータベースにも登録されている。即ち、これらの配列情報を元に適当な配列部分をPCRプライマーとして用い、例えば、肝臓、白血球由来のmRNAに対してRT-PCRを行うことによりHGFのcDNAをクローニングすることができる。このようなクローニングは、当業者であれば、例えば、Molecular Cloning 第2版(Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)等の基本書に従い容易に行うことができる。また、ゲノムDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、ゲノムDNAを単離することもできる。

さらに、本発明のHGF遺伝子はこれらのcDNA及びゲノムDNAに限定されず、発現されるタンパク質が実質的にHGFと同じ作用を有するタンパク質をコードする限り、本発明におけるHGF遺伝子として利用することができる。即ち、1)前記cDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸、または2)前記cDNAによりコードされるタンパク質のアミノ酸配列に対して1若しくは複数(好ましくは数個)のアミノ酸が欠失、置換、付加及び/または挿入されたアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする核酸のうちHGFの機能を有するタンパク質をコードするものであれば、本発明において使用され得るHGF遺伝子の範疇に含まれる。前記1)及び2)の核酸は例えば、部位特異的突然変異誘発法、PCR法(Current Protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) publish. John Wiley & Sons, Section 6.1-6.4 参照)、または通常のハイブリダイゼーション法(Current Protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) publish John Wiley & Sons, Section 6.3-6.4 参照)等の方法により容易に得ることができる。

即ち、当業者であれば、公知の HGF 遺伝子の配列またはその一部をプローブとして、或いは、該 DNA と特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドをプライマーとして、該 DNA とハイブリダイズする核酸を単離することができる。公知の HGF と機能的に同等なタンパク質をコードする核酸を得るためのハイブリダイゼーションのストリンジェントな条件としては、通常「1×SSC、37℃」程度の条件が挙げられ、より厳しい条件としては「0.5×SSC、0.1%SDS、42℃」程度、さらに厳しい条件としては「0.1×SSC、0.1%SDS、65℃」程度の条件を挙げることができる。ハイブリダイゼーションの条件を厳しく設定する程、プローブ配列と相同性の高い配列を有する核酸を単離することができる。但し、ここで挙げた SSC、SDS 及び温度についての条件は単なる例示であり、当業者であれば、これらの条件、及びプローブ濃度、プローブの長さ、反応時間等のその他のハイブリダイゼーションのストリンジェンシーを決定する条件を加味して、上記と同程度のストリンジェンシーが得られる条件を容易に設定することができる。

上述のようなハイブリダイゼーション法または PCR 法により単離される核酸によりコードされるタンパク質は、従来公知の HGF タンパク質に対して通常高いアミノ酸配列相同性を有する。高い相同性とは少なくとも 50%以上、さらに好ましくは 70%以上、さらに好ましくは 90%以上(例えば 95%以上)の配列相同性を指す。アミノ酸配列や塩基配列の同一性は、Karlin and Altschul によるアルゴリズム BLAST(Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90: 5873-5877 (1993))によって決定することができる。このアルゴリズムに基づいて、BLASTN や BLASTX 等のプログラムが開発されている(Altschul et al. J.Mol.Biol. 215: 403-410 (1990))。BLAST に基づき BLASTN によって塩基配列を解析する場合には、パラメーターは例えば score=100、wordlength=12 とする。また、BLAST に基づき BLASTX によってアミノ酸配列を解析する場合には、パラメーターは例えば score=50、wordlength=3 とする。BLAST と Gapped BLAST プログラムを用いる場合には、各プログラムのデフォルトパラメーターを用いる。これらの解析方法の具体的な

手法は公知である(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)。

以上のように本発明において使用される HGF 遺伝子は、該遺伝子によりコードされるタンパク質が HGF 活性を有する限り、天然由来及び人工的に製造された核酸であっても良い。HGF は *in vitro* において肝実質細胞の増殖を促進させる活性を有する。従って、上述のようにしてハイブリダイズ法等により得られた核酸または天然 HGF 遺伝子を改変した核酸によりコードされるタンパク質が HGF 活性を有するかどうかは、例えば、該タンパク質の *in vitro* における肝実質細胞の増殖に対する影響を調べることにより検定することができる。

次に、本発明の遺伝子治療において用いられる遺伝子導入方法、導入形態及び導入量等について記述する。

HGF 遺伝子を有効成分とする遺伝子治療剤を患者に投与方法としては、非ウイルスベクターを用いる方法と、ウイルスベクターを用いる方法の 2 つに大別できる。実験手引書等にベクターの調製法、投与方法等が詳しく解説されている(別冊実験医学, 遺伝子治療の基礎技術、羊土社(1996); 別冊実験医学, 遺伝子導入 & 発現解析実験法、羊土社(1997); 日本遺伝子治療学会編遺伝子治療開発研究ハンドブック、エヌ・ティー・エス(1999))。以下、それらのベクター及び方法について具体的に説明する。

慣用の非ウイルス遺伝子発現ベクターに目的とする遺伝子が組み込まれた組換え発現ベクターを用いて、以下のような手法により目的遺伝子を細胞や組織に導入することができる。

細胞への遺伝子導入法としてはリポフェクション法、リン酸-カルシウム共沈法、DEAE-デキストラン法、微小ガラス管を用いた DNA の直接注入法等が挙げられる。また、組織への遺伝子導入法としてはウイルス-エンベロープ法、内包型リポソーム(internal type liposome)による遺伝子導入法、静電気型リポソーム(electrostatic type liposome)による遺伝子導入法、HVJ-リポソーム法、改良型 HVJ-リポソーム法(HVJ-AVE リポソーム法)、レセプター介在性遺伝子導入法、

パーティクルガンで担体(金属粒子)と共に DNA 分子を細胞に移入する方法、naked-DNA の直接導入法、正電荷ポリマーによる導入法等のいずれかの方法により、組換え発現ベクターを細胞内に取り込ませることができる。

このうち HVJ-リポソームは脂質二重膜で作られたリポソーム中に DNA を封入し、さらにこのリポソームと不活化したセンダイウイルス(Hemagglutinating virus of Japan:HVJ)とを融合させたものである。当該 HVJ-リポソーム法は従来のリポソーム法と比較して、細胞膜との融合活性が非常に高いことを特徴とするものであり、特に好ましい導入形態の一つである。HVJ-リポソームの調製法については、別冊実験医学、遺伝子治療の基礎技術、羊土社(1996)；別冊実験医学、遺伝子導入&発現解析実験法、羊土社(1997)；J.Clin.Invest.93:1458-1464(1994)；Am.J.Physiol. 271: R1212-1220(1996)等に詳しく述べられている。また HVJ リポソーム法とは、例えば Molecular Medicine 30: 1440-1448(1993)；実験医学 12: 1822-1826(1994)；蛋白質・核酸・酵素 42,1806-1813(1997)等に記載の方法であり、好ましくは Circulation 92(Suppl.II): 479-482(1995)に記載の方法が挙げられる。

また、本発明の HGF 遺伝子の投与において特に好ましい方法としてウイルス-エンベロープを用いる方法を挙げることができる。ウイルス-エンベロープは精製されたウイルスに所望の発現ベクターを界面活性剤存在下で混和するか、または、ウイルスと発現ベクターとの混合液を凍結融解することにより調製することができる(特願 2001-026185/特開 2001-286282)。

ウイルス-エンベロープ法において用いることができるウイルスとしては、例えば、レトロウイルス、トガウイルス、コロナウイルス、フラビウイルス、パラミクソウイルス、オルトミクソウイルス、プニヤウイルス、ラブドウイルス、ポックスウイルス、ヘルペスウイルス、バキュロウイルス、ヘパドナウイルス等の科に属するウイルス、中でも好ましくは HVJ が挙げられる。ここで、ウイルスとしては、野生型及び組換え型のいずれのウイルスを用いることができる。特に

HVJ としては、Hasan M.K.ら (J.General Virol. 78: 2813-2820 (1997))、または、Yonemitsu Y.ら (Nature Biotech. 18: 970-973 (2000))等により報告されている組換え型の HVJ を用いることもできる。

一般に、HVJ-リポーソーム法及び HVJ-エンベロープ法において用いる HVJ としては Z 株(ATCC より入手可能)が好ましいが、基本的には他の HVJ 株(例えば ATCC VR-907 や ATCC VR-105 等)も用いることができる。また、ウイルスエンベロープの調製する際に、精製されたウイルスを UV 照射等により不活性化した後、所望の発現ベクターを混和しても良い。ウイルスと発現ベクターを混和する際に用いることができる界面活性剤としては、例えば、オクチグルコシド、Triton X-100、CHAPS、NP-40 等が挙げられる。このようにして調製されたウイルスエンベロープベクターは、注射等により治療または予防の標的となる組織に導入することができる。また、-20℃で凍結することにより、少なくとも 2~3 ヶ月保存することも可能である。

ここで用いることができる発現ベクターとしては、生体内で目的遺伝子を発現されることのできるベクターであれば如何なる発現ベクターであっても良い。例えば pCAGGS (Gene108: 193-200(1991))や、pBK-CMV、pcDNA3.1、p ZeoSV(インビトロゲン社、ストラタジーン社)等の発現ベクターを例示することができる。

ウイルスベクターとしては、組換えアデノウイルス、レトロウイルス等のウイルスベクターを用いた方法が代表的である。より具体的には、例えば、無毒化したレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、レンチウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、ポリオウイルス、シンプスウイルス、センダイウイルス、SV40、免疫不全症ウイルス(HIV)等の DNA ウイルスまたは RNA ウイルス (Pharmacol.Ther.80: 35-47 (1998); Front.Biosci. 4: E26-33 (1999); J.Recep.Signal.Transduct.Res.19: 673-686 参照) に目的とする遺伝子を導入し、細胞に組換えウイルスを感染させることによって細胞内に遺伝子を導入することができる。

前記ウイルスベクターのうち、アデノウイルスの感染効率が他のウイルスベクターを用いた場合よりもはるかに高いことが知られており、この観点からはアデノウイルスベクター系を用いることが好ましい。

本発明の遺伝子治療剤の患者への導入法としては、遺伝子治療剤を直接体内に導入する *in vivo* 法及びヒトからある種の細胞を取り出して体外で遺伝子治療剤を該細胞に導入し、その細胞を体内に戻す *ex vivo* 法が挙げられる（日経サイエンス、1994 年 4 月号：20-45 頁；月刊薬事 36(1)：23-48(1994)；実験医学増刊 12(15)：(1994)；日本遺伝学治療学会編 遺伝子治療開発研究ハンドブック、エヌ・ティー・エス(1999)）。本発明では、*in vivo* 法が特に好ましい。

製剤形態としては、上記の各投与形態に合った種々の製剤形態（例えば液剤等）をとり得る。例えば有効成分である遺伝子を含む注射剤として製剤する場合、このような注射剤は定法により調製することができ、例えば適切な溶剤（PBS 等の緩衝液、生理食塩水、滅菌水等）に溶解した後、必要に応じてフィルター等で濾過滅菌し、次いで無菌的な容器に充填することにより調製することができる。必要に応じて、注射剤には慣用の担体等を加えても良い。また、HVJ-リポソーム等のリポソーム製剤としては、懸濁剤、凍結剤、遠心分離濃縮凍結剤等の形態が挙げられる。

本発明の治療剤または予防剤では、HGF 遺伝子を単独の有効成分として利用することもできるし、または、その他の血管新生作用を有する公知の因子と併用することもできる。例えば、VEGF や EGF 等の因子は血管新生作用を有することが報告されており、これらの因子をコードする遺伝子を併用することもできる。また EGF 等の増殖因子は組織の種々の細胞障害を修復することが報告されていることから、必要に応じ、各種増殖因子をコードする遺伝子を併用することも可能である。本明細書の記載から、本発明の治療剤または予防剤に、必要に応じ、治療または予防対象とする脳血管障害に対し治療若しくは予防効果を有するその他の薬剤、HGF を安定化若しくは増強する物質（例えば、ヘパリン様物質（特

開平 10-158190 号公報)；多糖類(特開平 5-301824 号公報等)を HGF 遺伝子と併用し得ることが当業者には明らかである。これらの薬剤及び物質が遺伝子によりコードされ得るものであれば、これらをコードする遺伝子を本発明の治療剤または予防剤において HGF 遺伝子と共に投与することもできる。

本発明の遺伝子治療剤または予防剤は治療目的の疾患、症状等に応じた適当な投与方法及び投与部位が選択される。特に、非経口的な投与が好ましい。また投与部位としては、大槽及び腰椎が特に好ましく、大槽または腰椎の髄膜内に穿刺し、穿刺位置の確認と頭蓋内圧の上昇を避ける為に適量の髄液を採取後、本治療剤または予防剤を投与する。本発明の治療剤または予防剤の大槽への投与については、例えば、Hayashi K.ら(Gene Therapy 8: 1167-73 (2001))により報告されたカニューレを用いた HVJ-リポソーム複合体の投与方法を応用することができる。

ところで、本発明の治療剤または予防剤の効果は、HGF 遺伝子の投与により、脳梗塞巣周辺のいわゆるペナンプラ (penumbra) 領域においてアポトーシスが抑制され、神経細胞が維持されとことにより得られると考えられる。従って、本発明における治療とは、脳における血流障害が起きた後の処置によって血流障害の影響を小さくすることを言う。

即ち、より具体的には、本発明の薬剤または方法による治療効果とは、脳血管障害発症後の本発明の薬剤の投与または方法の適用によって、脳血管障害によってもたらされる脳組織の損傷を、非投与の場合と比べて小さくする効果を指す。したがって、本発明における治療には、損傷の完全な回復のみならず、損傷の程度を小さくする作用が含まれる。

一方本発明における予防とは、脳における血流障害が起きる前に、HGF 遺伝子を予防的に投与することによって、血流障害の影響を小さくできることを言う。より具体的には、脳梗塞等の脳血管障害発症前の HGF 遺伝子の投与によって、投与後に生じた脳血管障害によってもたらされる脳組織の損傷を、非投与の場合に比べて小さくできるとき、HGF 遺伝子投与には予防効果があると言う。した

がって、本発明における予防には、損傷の完全な回復のみならず、損傷の程度を小さくする作用が含まれる。

また本発明における「治療剤」または「予防剤」という用語は、上記のような作用を有する医薬品製剤を意味する用語として用いられる。あるいは本発明における治療方法または予防方法は、上記のような作用を有する医薬品製剤を投与する工程を含む方法である。

一方本発明における脳血管障害とは、脳の血流が阻害された状態を言う。脳の血流阻害を生じる疾患として、脳梗塞や脳内出血を示すことができる。血流の阻害は、疾患によってもたらされたものに限られない。たとえば、外科的処置に伴う人為的な血管の閉鎖や、創傷による血管の損傷が原因となって生じる血流が低下した状態も、本発明における脳血管障害に含まれる。例えば、脳実質に虚血または梗塞性病変をもたらす脳血管障害疾患・脳梗塞(脳血栓、脳塞栓等)、脳出血、くも膜下出血、高血圧性脳症、脳血管性痴呆、アルツハイマー型痴呆等が本発明における脳血管障害に含まれる。

本発明の治療剤または予防剤には、該薬剤により意図される目的を達成するのに十分な量、即ち「治療的有効量」または「薬理学的に有効な量」の HGF 遺伝子が含まれる。「治療的有効量」または「薬理学的に有効な量」とは、意図される薬理学的結果を生じるために有効な薬剤の量であり、処置されるべき患者の徴候を軽減するのに十分な量である。所定の適用における有効量を確認する有用なアッセイ法としては、標的疾患の回復の程度を測定する方法が挙げられる。実際に投与されるべき量は、処置される患者の年齢、体重及び症状、並びに投与方法等に依存するが、好ましくは、所望の効果が顕著な副作用を伴うことなく達成されるよう最適化された量である。

治療的有効量、薬理学的に有効な量、及び、毒性は、細胞培養アッセイまたは任意の適切な動物モデルにより決定することができる。また、そのような動物モデルは所望の濃度範囲および投与経路を達成するのに用い、当業者であれば、そ

れに基づきヒトにおける有効量を決定することができる。治療効果と毒性効果との間の用量比は治療係数であり、それは比率 ED_{50}/LD_{50} として表すことができる。大きな治療係数の薬学的組成物が好ましい。決定された用量は、使用される投与形態、患者の感受性、年齢やその他の患者の条件、疾患の種類、重篤さ等により適宜選択され、本発明の治療剤の投与量としては、患者の症状等によって異なるが、成人患者 1 人当たり HGF 遺伝子として約 $1 \mu g \sim 50 mg$ の範囲、好ましくは約 $10 \mu g \sim 5 mg$ 、より好ましくは約 $50 \mu g \sim 5 mg$ の範囲から投与量が選択される。特に、HGF 遺伝子を HVJ エンベロープ法により投与する場合には、反復して投与を行うことが可能であることから、1 回のみ投与するのではなく、より良い治療または予防効果を得るために複数回、例えば 2、3 回にわたって HGF 遺伝子の投与を行うことができる。このような HVJ エンベロープを用いた複数回にわたる投与も本発明の治療・予防方法に包含される。

図面の簡単な説明

図 1 は、生理食塩水群のラット(6 匹中 3 匹)についての TTC 染色を行った冠状断の写真である。

図 2 は、pVAXI 群のラット(6 匹中 3 匹)についての TTC 染色を行った冠状断の写真である。

図 3 は、HGF 群のラット(6 匹中 3 匹)についての TTC 染色を行った冠状断の写真である。

図 4 は、生理食塩水群、pVAXI 群及び HGF 群における梗塞巣面積を比較したグラフである。右上にラットの脳の模式図を示す。1～5 で示される線において切断し、冠状断を作成した。模式図の番号 1～5 はグラフ横軸の数字に対応する。縦軸は、冠状断全体の面積に占める梗塞巣の面積の割合(%)を示す。

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によりなんら限定されるものではない。

(1)HGF 遺伝子発現ベクターの作成

ヒト HGF cDNA (2.2kb) を pVAX1 ベクターの BamHI、NotI (Invitrogen) に挿入した。

(2)HVJ-エンベロープの調製

精製センダイウイルス (HVJ) (Z 株) を使用直前に UV 照射 (99mJ/cm²) することにより不活性化した。次に不活性化 HVJ (15000 血球凝集単位(HAU)) と上記(1)において作成したベクター、または HGF cDNA を含まない発現ベクターを 4℃において 0.3%Triton X-100 と混和し、4℃で 15 分間遠心分離した。上清を除去し、緩衝塩類溶液を加え、再度 4℃で 15 分間遠心した。上清を除去し、リン酸緩衝整理食塩水 100 μ l に溶解し、脳梗塞に対する効果を調べた。

(3)HVJ エンベロープ-DNA 複合体のラット右中大脳動脈閉塞モデルラットへの投与

体重 250~270g の Wistar ラットをハロセン麻酔 (導入時 4%、1%で維持)し、1)生理食塩水群として生理食塩水(100 μ l)、2)ベクターのみを含む pVAXI 群として pVAXI(400 μ g)/HVJ-E(15000HAU)(100 μ l)、3)HGF 投与群として pVAXI-HGF(400 μ g)/HVJ-E(15000HAU) (100 μ l を 26G 針を用い大槽投与した。各群について 6 匹の動物を用いた。投与 3 日後に、ハロセン麻酔下で右外頸動脈から右内頸動脈に poly-L-lysine でコーティングされた 4-0 ナイロン糸を 21mm 挿入し、右中大脳動脈モデルを作成した。その際、ヒーティングパッドにて動物の体温は約 37℃前後に維持し、尾動脈にて血圧を測定した。1 時間後及び 24 時間後に神経評価を行った。神経評価は以下の基準で行い、合計のスコアとして各群の比較(表 1 において Neurological severity score (NSS)として表した)を行った。StadtView 5.0 J を使用し、Mann-Whitney U test により統計処理を行った。

- 18 -

1) 左前肢の屈曲の有無

- 0 . . . 屈曲なし
 0.5 . . . 軽度の屈曲
 1 . . . 完全に屈曲

2) 側方圧迫への抵抗

- 0 . . . 左右同程度の抵抗
 0.5 . . . 軽度の抵抗減弱
 1 . . . 完全に抵抗無し

3) 体位

- 0 . . . 正常
 0.5 . . . 左に軽度の屈曲
 1 . . . 完全に左に屈曲

4) 左前肢の肢位

- 0 . . . 迅速に元にもどる
 0.5 . . . 元にもどる
 1 . . . 元に戻らない

5) 右前肢の肢位

- 0 . . . 迅速に元にもどる
 0.5 . . . 元にもどる
 1 . . . 元に戻らない

表 1

| | HGF/HVJ | pVAXI/HVJ | 生理食塩水 | p 値 |
|------------|-----------|-----------|-----------|---------|
| 体重 | 250.4±2.0 | 253±2.3 | 251.8±2.4 | |
| 血圧(処置前) | 88.6±1.9 | 88.8±3.7 | 88.5±2.1 | |
| 血圧(処置後) | 82.4±1.7 | 81.2±3.8 | 82.8±1.4 | |
| 体温(処置前) | 37.4±0.1 | 37.3±0.1 | 37.2±0.2 | |
| 体温(処置後) | 37.6±0.1 | 37.1±0.2 | 37.4±0.2 | |
| NSS (1hr) | 1.0±0.2 | 1.3±0.4 | 1.4±0.2 | p<0.05* |
| NSS (24hr) | 1.0±0.1 | 1.4±0.2 | 1.3±0.3 | p<0.05* |

*Mann-Whitney U test により生理食塩水群との比較。

表 1 に示すように、生理食塩水群、pVAXI 群、HGF 群の間で術中の血圧、体温に差は見られなかった。また、神経評価では、HGF 群では他の 2 つの群と比べてスコアが有意に低値であり、HGF 遺伝子の投与により神経機能が保たれていることが示唆された。

24 時間後に動物を殺し、前頭極から 2mm 間隔（図 4 の右上の模式図において線 1～5 として示す部位）で冠状断を作成した。TTC 染色を行い梗塞巣の面積を比較した（図 1～3）。梗塞巣の面積の比較のため、Adobe Photoshop 5.0 を使用し、梗塞巣の占める Pixel 数を計測した。浮腫の影響を考慮し（健常側面積－（梗塞側面積－梗塞面積））/健常側面積×100（%）で評価した。その結果を図 4 に示す。冠状断の全体に占める梗塞巣の割合を%で示す。図 1～図 4 より明らかなように、HGF 遺伝子導入群では梗塞巣が小さくなることが確認された。

産業上の利用の可能性

以上の結果により HGF 遺伝子の投与が脳梗塞のような脳血管障害の初期段階で有利な効果を示し、神経機能の維持し、梗塞巣を小さくすることが確認された。即ち、HGF が脳血管障害を調節する役割を果たすかもしれないことが示された。本発明により、HGF 遺伝子の導入による HGF の過剰発現という、新しい脳梗塞を含む脳血管障害の治療法が提供された。本発明の HGF 遺伝子を使用した方法により、脳梗塞を含む脳血管障害に対して積極的な遺伝子導入による治療を行うことができ、従来、適切な治療法のなかった患者において神経機能の維持、梗塞巣の抑制が可能となる。

請求の範囲

1. HGF 遺伝子を含む脳血管障害の治療剤または予防剤。
2. 脳血管障害が脳梗塞である、請求項 1 記載の治療剤または予防剤。
3. 該治療剤又は予防剤が錠剤、丸剤、糖衣剤、カプセル、液剤、ゲル剤、軟膏、シロップ、スラリー、懸濁剤の形態である、請求項 1 または 2 記載の治療剤または予防剤。
4. 遺伝子をウイルス・エンベロープ法、内包型リポソーム法、静電気型リポソーム法、HVJ-リポソーム法、改良型 HVJ-リポソーム法、レセプター介在性遺伝子導入法、パーティクルガンで担体と共に核酸分子を細胞に移入する方法、naked-DNA による直接導入法、若しくは正電荷ポリマーによる導入法のいずれかにより細胞に移入するための、請求項 1～3 いずれかに記載の治療剤または予防剤。
5. 遺伝子を HVJ-エンベロープ法により細胞に移入するための、請求項 1～3 いずれかに記載の治療剤または予防剤。
6. HGF 遺伝子を哺乳動物に導入する工程を含む、脳血管障害の治療または予防法。
7. 脳血管障害が脳梗塞である、請求項 6 記載の治療または予防法。
8. HGF 遺伝子を HVJ-エンベロープ法により 2～3 回哺乳動物に導入する工程を含む、請求項 6 または請求項 7 記載の治療または予防法。
9. 脳血管障害の治療剤または予防剤の製造のための HGF 遺伝子の使用。
10. 脳血管障害が脳梗塞である、請求項 9 記載の HGF 遺伝子の使用。

☒ 1

1 / 4

No.1

No.4

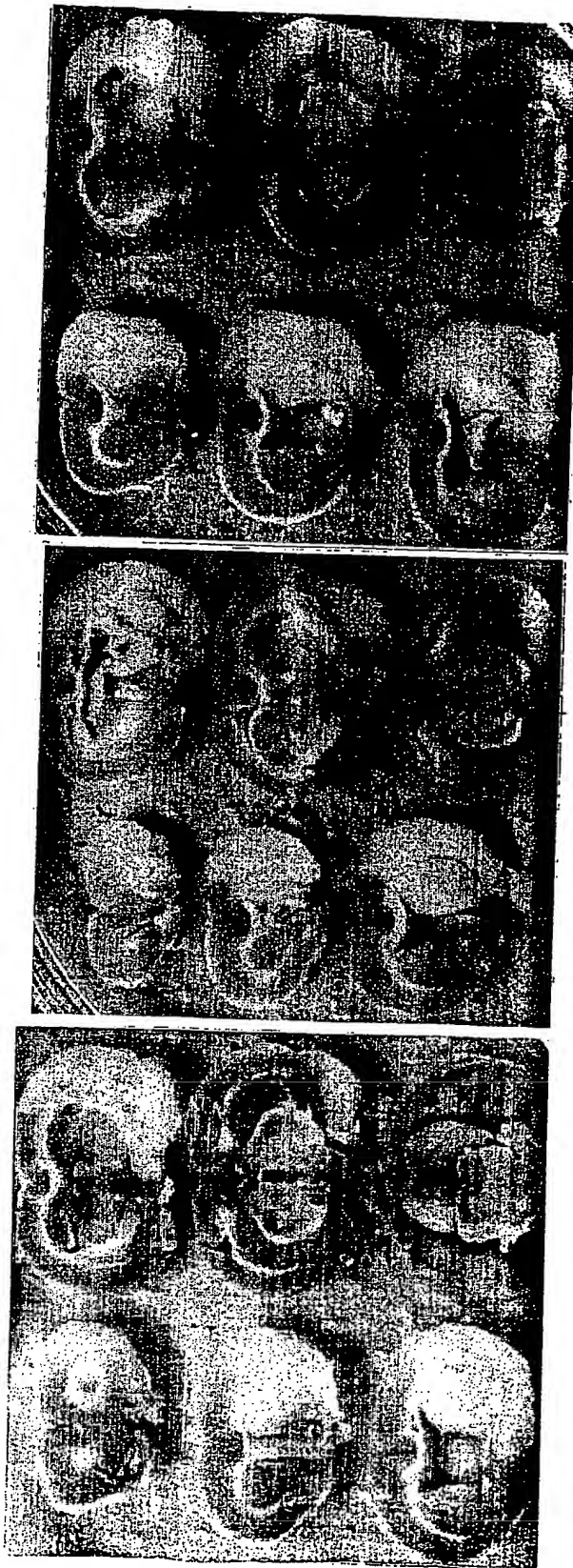
No.5



図 2

2 / 4

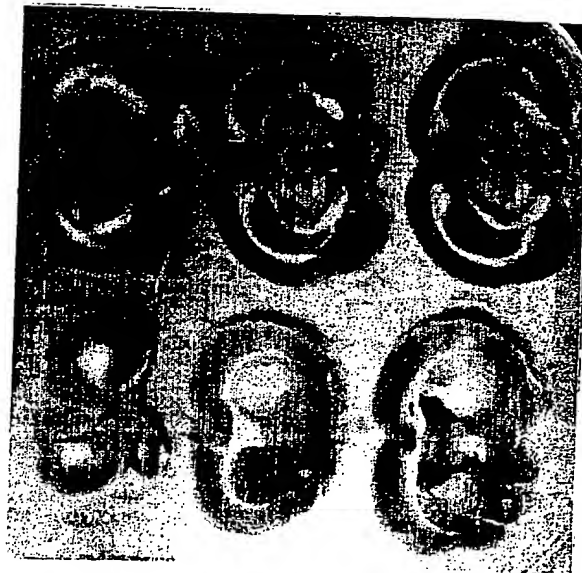
No.1 No.3 No.6



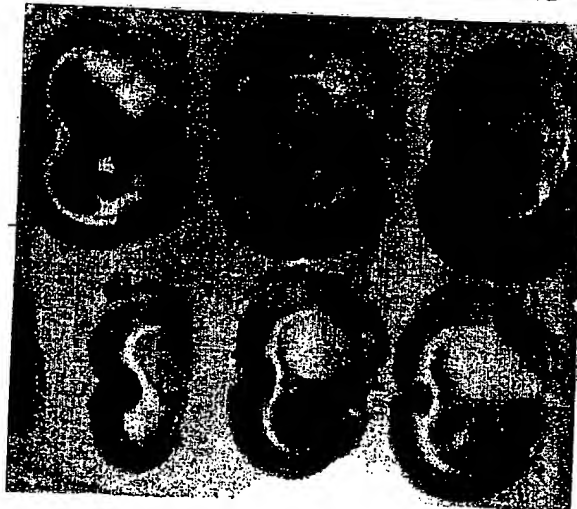
3 / 4

図 3

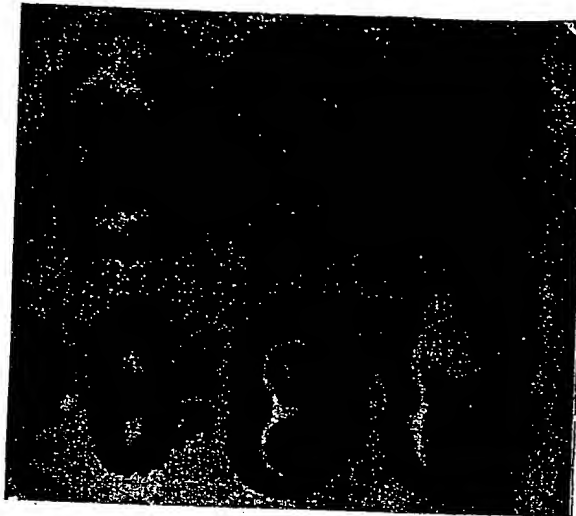
No.1



No.4

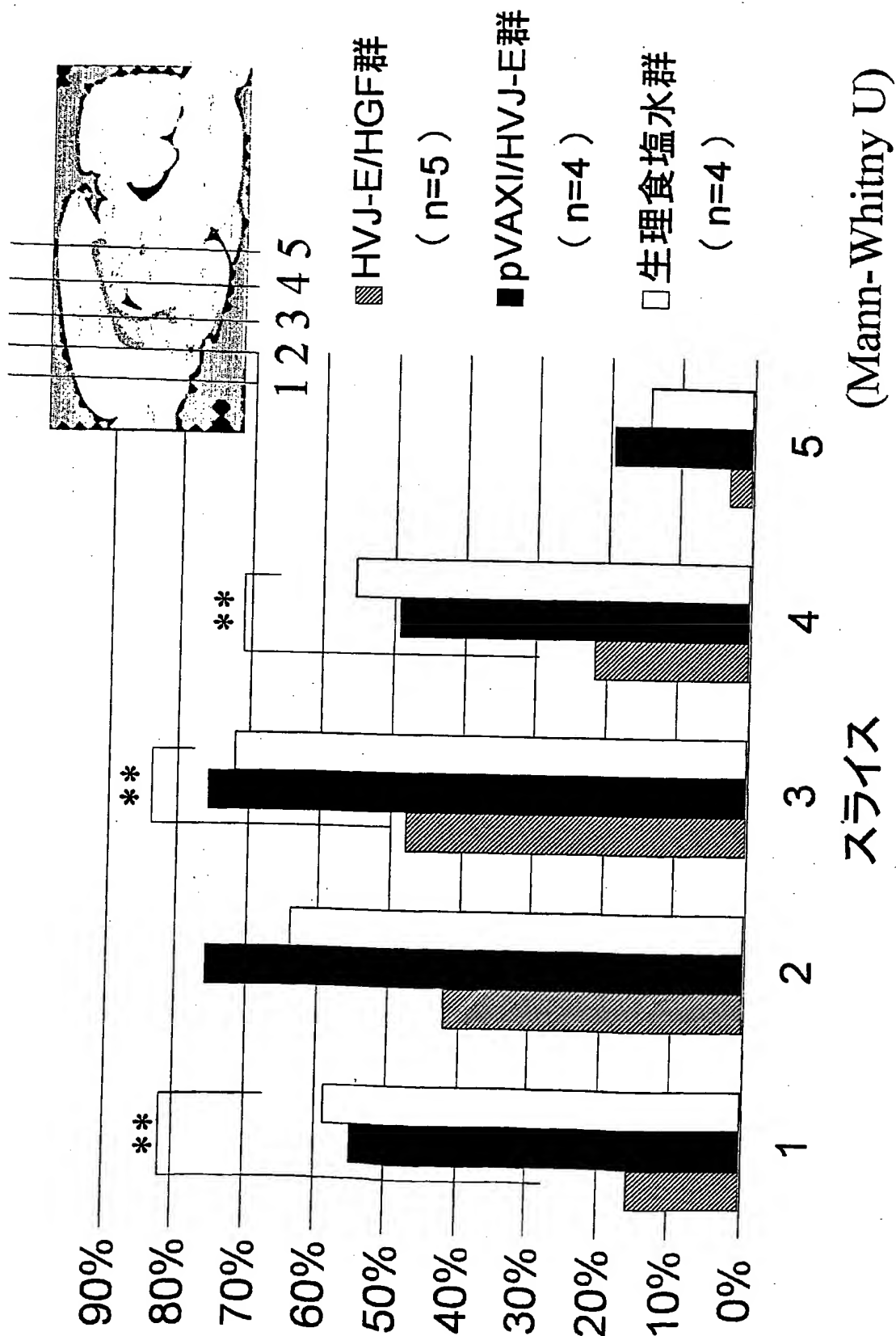


No.5



4 / 4

図 4



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/07004

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K48/00, 38/27, 9/06, 9/08, 9/107, 9/20, 9/28, 9/48,
31/711, A61P9/00, 9/10, 25/28, 43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K48/00, 38/27, 9/06, 9/08, 9/107, 9/20, 9/28, 9/48,
31/711, A61P9/00, 9/10, 25/28, 43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1926-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2003
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2003 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2003

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA/MEDLINE/BIOSIS/EMBASE (STN), JSTPlus/JMEDPlus (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| X Y | EP 1132098 A1 (MedGene Bioscience, Inc.), 12 September, 2001 (12.09.01), Claims 1, 2 & WO 01/021214 A1 | 1-4, 9, 10 5 |
| X Y | Akihiko ISHIDA et al., "Nokosoku (Nokyoketsu) ni Taisuru Idenshi Chiryo, Noshinkei", 2002 March, Vol.54, No.3, pages 213 to 219, particularly, page 216, lower right column | 1-4, 9, 10 5 |
| Y | EP 722737 A1 (SUMITOMO PHARMACEUTICALS CO.), 24 July, 1996 (24.07.96), Claim 1; page 5, lines 32 to 36 & WO 95/07709 A1 & US 2003/0060403 A1 | 1-5, 9, 10 |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

| | |
|---|--|
| * Special categories of cited documents: | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance | "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone |
| "E" earlier document but published on or after the international filing date | "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art |
| "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | "&" document member of the same patent family |
| "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means | |
| "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | |

| | |
|---|--|
| Date of the actual completion of the international search 30 July, 2003 (30.07.03) | Date of mailing of the international search report 12 August, 2003 (12.08.03) |
| Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office | Authorized officer |
| Facsimile No. | Telephone No. |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/07004

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| Y | <p>EP 1170363 A1 (KANEDA, Yasufumi), 09 January, 2002 (09.01.02), Claim 4</p> <p>& WO 01/57204 A1 & AU 200130578 A & JP 2001-286282 A & KR 2002004987 A</p> | 5 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/07004

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 6-8

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 6 to 8 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K48/00, 38/27, 9/06, 9/08, 9/107, 9/20, 9/28, 9/48, 31/711, A61P9/00, 9/10, 25/28, 43/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K48/00, 38/27, 9/06, 9/08, 9/107, 9/20, 9/28, 9/48, 31/711, A61P9/00, 9/10, 25/28, 43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1926-1996年
 日本国公開実用新案公報 1971-2003年
 日本国実用新案登録公報 1996-2003年
 日本国登録実用新案公報 1994-2003年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
 CA/MEDLINE/BIOSIS/EMBASE (STN),
 JSTPlus/JMEDPlus (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|--|------------------|
| X Y | EP 1132098 A1 (MedGene Bioscience, Inc.) 2001.09.12, Claim1, 2参照 & WO 01/021214 A1 | 1-4, 9, 10 5 |
| X Y | 石田昭彦 他3名、脳梗塞 (脳虚血) に対する遺伝子治療、脳神経、2002年3月、Vol.54, No.3, p.213-219、 特に216頁右下欄等参照 | 1-4, 9, 10 5 |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

30.07.03

国際調査報告の発送日

12.08.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J.P)
 郵便番号100-8915
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

富永 保

4C 3039

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

| C (続き) 関連すると認められる文献 | | |
|---------------------|---|------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| Y | EP 722737 A1 (SUMITOMO PHARMACEUTICALS COMPANY) 1996. 07. 24, Claim1、第5頁第32-36行参照 & WO 95/07709 A1 & US 2003/0060403 A1 | 1-5, 9, 10 |
| Y | EP 1170363 A1 (Kaneda Yasufumi) 2002. 01. 09, Claim4等参照 & WO 01/57204 A1 & AU 200130578 A & JP 2001-286282 A & KR 2002004987 A | 5 |

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 6-8 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、

請求の範囲6-8は、治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。

2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

DESCRIPTION

AGENTS FOR GENE THERAPY OF CEREBROVASCULAR DISORDERS

5 Technical Field

The present invention relates to the treatment or prevention of cerebrovascular disorders by using a hepatocyte growth factor (HGF) gene. More specifically, the present invention relates to agents for treatment or prevention, that comprise an HGF gene as an active ingredient, and
10 methods that comprise the step of administering such an agent to a target site.

Background Art

Hepatocyte growth factor (HGF) is a cytokine discovered as a factor
15 that causes proliferation of hepatic parenchymal cells *in vitro* (Biochem. Biophys. Res. Commun. 122: 1450 (1984); Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 6489 (1986); FEBS Letters 22: 231 (1987); Nature 342: 440-443 (1989); Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 3200 (1991)). HGF is a plasminogen-related and mesenchyme-derived pleiotropic growth factor,
20 and is known to regulate cell growth and cell motility in various types of cells (Nature 342: 440-443 (1989); Biochem. Biophys. Res. Commun. 239: 639-644 (1997); J. Biochem. Tokyo 119: 591-600 (1996)). HGF is also known to be an important factor regulating embryogenesis and morphogenic processes in the regeneration of a number of organs (Exp.
25 Cell Res. 196: 114-120 (1991); Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 1937-1941 (1993); Gene Therapy 7: 417-427 (2000)). HGF not only contributes *in vivo* as a liver regeneration factor in the repair and regeneration of damaged liver, it has also been shown to possess an angiogenic effect, and can play an important role in the treatment or prevention of ischemic
30 or arterial diseases (Symp. Soc. Exp. Biol. 47 cell behavior 227-234 (1993); Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 1937-1941 (1993); Circulation 97: 381-390 (1998)).

Since HGF displays a variety of functions, including angiogenic

functions, as described above, various studies for its use in pharmaceutical agents have been carried out (Jikken Igaku (Experimental Medicine) (supplementary volume) 10(3): 330-339 (1992)). For example, there are reports of using HGF as an:

- 5 anticancer agent (Unexamined Published Japanese Patent Application No. (JP-A) Hei 6-25010);
- therapeutic agent for lung injuries (JP-A Hei 6-172207);
- agent for relieving the side effects of cancer therapy (JP-A Hei 6-340546);
- 10 agent for enhancing the growth of epithelial cells (JP-A Hei 7-179356);
- agent for relieving the side effects of immunosuppressants (JP-A Hei 7-258111);
- therapeutic agent for fulminant hepatitis (JP-A Hei 10-167982);
- 15 therapeutic agent for myocardial infarctions (JP-A Hei 11-246433);
- therapeutic agent for arterial diseases (JP-A Hei 8-295634);
- therapeutic agent for obesity (JP-A Hei 10-279500);
- therapeutic agent for dilated cardiomyopathy (JP-A Hei 11-1439);
- 20 therapeutic agent for amyotrophic lateral sclerosis (JP-A 2002-87983);
- preventive agent for pulmonary fibrosis (JP-A Hei 8-268906);
- therapeutic agent for cartilage disorders (JP-A Hei 8-59502);
- collagen degradation promoting agent (JP-A Hei 7-300426);
- 25 therapeutic agent for gastroduodenal diseases (JP-A Hei 7-138183);
- therapeutic agent for cranial nerve disorders (JP-A Hei 7-89869);
- therapeutic agent for acute renal failure (Published Japanese Translation of International Publication No. 2001-516358);
- 30 therapeutic agent for ischemic diseases/arterial diseases (WO 00/07615);
- therapeutic agent for diabetes (WO 98/32458);
- external agent for hair (JP-A Hei 5-213721);

dermal cosmetics (JP-A Hei 5-213733);
 agent for promoting hair growth (JP-A Hei 5-279230);
 agent for increasing megakaryocytes (JP-A Hei 7-101876);
 differentiation-inducing agent (JP-A 2002-78482);
 5 therapeutic agent for renal glomerular diseases (JP-A Hei
 9-87199);
 therapeutic agent for cachexia (JP-A Hei 10-316584);
 therapeutic agent for multiple organ failure (JP-A Hei 10-310535);
 therapeutic agent for ischemic diseases (WO 96/32960);
 10 agent for cell proliferation and differentiation (Published
 Japanese Translation of International Publication No. Hei 10-503923);
 agent for growth and differentiation of hematopoietic cells
 (Published Japanese Translation of International Publication No. Hei
 10-509951);
 15 agent for improving neuropathy (JP-A Hei 7-41429); and
 therapeutic agent for hypoglycemia and glycogen diseases (JP-A
 Hei 10-7586).

Typically, proteinaceous formulations are administered
 intravenously. In ischemic disease models, HGF administration is
 20 exemplified by intravenous and intra-arterial administration
 (Circulation 97: 381-390 (1998)). Although intravenous or
 intra-arterial HGF administration has been shown to be effective in this
 type of animal model, no conclusions have been reached regarding
 effective methods of administration, dosages, and such of HGF for
 25 specific diseases. In particular, HGF's short half-life in the blood
 has emerged as a problem when applying HGF proteins as pharmaceutical
 agents. Since the half-life of HGF in the blood is short as ten minutes,
 it has been difficult to maintain HGF concentration in the blood at a
 level where HGF functions sufficiently. Furthermore, another challenge
 30 has been raised regarding the delivery of an effective amount of HGF
 to affected sites.

Thanks to remarkable technological progress in the field of
 molecular biology, gene therapy involving the introduction of genes into

cells is now possible. Gene therapy can generally be used in various medical treatments (Science 256: 808-813 (1992); Anal. Biochem. 162: 156-159 (1987)). Selecting an appropriate vector for gene transfer is particularly important for successful gene therapy. So far, vectors derived from viruses such as adenoviruses have been suggested for use in gene transfer.

However, viral vectors have also been suggested to potentially have the following dangers:

viral infection-associated toxicity;

development of viral pathogenicity associated with the depressed immunological function of the host;

mutagenic or carcinogenic nature of the viruses; and such.

As an alternative to methods using viral vectors, *in vivo* gene transfer methods using liposomes together with viral outer membranes, or HVJ-liposome-mediated gene transfer methods, have been developed (Science 243: 375-378 (1989); Anal. NY Acad. Sci. 772: 126-139 (1995)). *In vivo* gene transfers into various tissues, including the liver, kidney, vascular wall, heart, and brain, have been successfully accomplished using these methods (Gene Therapy 7: 417-427 (2000); Science 243: 375-378 (1989); Biochem. Biophys. Res. Commun. 186: 129-134 (1992); Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 8474-8478 (1993); Am. J. Physiol. 271 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 40):R1212-R1220 (1996)).

However, since methods using HVJ-liposomes require different vehicles, such as viruses and liposomes, they are complicated to prepare. Furthermore, fusing HVJ virions with liposomes makes the average diameter of the resultant particles 1.3 times that of a viral particle. This increased diameter is known to reduce cell fusion activity to 10% or less of that of a wildtype virus, and there are tissues to which gene transfer is impossible or inefficient. Accordingly, a gene transfer method that uses viral envelope vectors was developed as a method that allows safer and more efficient gene therapy (Japanese Patent Application No. 2001-026185 / JP-A 2001-286282). In this method, an inactivated virus, which cannot replicate viral proteins, is used as

a viral envelope, and genes are enclosed within this viral envelope. The vector can be used for gene transfer into cultured cells, biological tissues, and such. The use of such viral envelope vectors is known to enable safe and highly efficient gene transfer into the liver, skeletal muscle, uterus, brain, eyes, carotid arteries, skin, blood vessels, lungs, heart, kidneys, spleen, cancer tissues, nerves, B lymphocytes, respiratory organ tissue, suspended cells, and such.

Cerebrovascular disorders, represented by cerebral infarctions and intracerebral hemorrhages, are important diseases that are also socially significant. Although mortality due to cerebrovascular disorders has declined in recent years, such diseases are still highly ranked causes of death. Patients affected with the aftereffects of an ischemic cerebrovascular disorder, and hospitalized or outpatients being treated by clinical institutions, still continue to increase.

Generally, a cerebral infarction is a condition whereby the brain tissue becomes irreversibly necrotic, due to ischemic lesions caused by occlusion, or by a decrease of perfusion pressure in the cerebral artery or carotid artery. Cerebral infarctions can be categorized into following three major groups (Manabe, H., and Omae, T. Ed. "Nou-Kekkan Shogai (Cerebrovascular disorder)" Life Science Publishing, p54-55 (1992); Imura, H. et al. Ed., "Saishin Naikagaku Taikei Dai 66 Kan Nou-Kekkan Shogai (Integrated handbook of internal medicine, Vol. 66, Cerebrovascular disorder)" Nakayama Shoten, p28 (1996)):

(1) cerebral thrombosis, in which ischemic necrosis occurs in the cerebral tissue as a result of arterial occlusion, where the arterial occlusion is caused by increased blood viscosity, decreased perfusion pressure, or such, arising from sclerotic lesions in the cerebral artery;

(2) cerebral embolism, in which an embolus forms in the cerebral artery due to an intracardiac thrombus or, although rare, due to a thrombus detached from the arterial wall; and

(3) hemodynamic infarction, caused by reduced blood flow to the peripheral brain tissue due to the constriction or occlusion of the cephalic artery or intracranial cerebral artery.

In cerebral infarction, a cerebral edema occurs within a few hours of the onset of disease, and this condition continues for approximately one week after onset. Thereafter, the edema gradually decreases, but becomes fixed as an infarcted area within one to three months after onset.

5 The cerebral edema causes the volume of the brain to increase. Since the brain is covered with a hard cranium, when the volume of the brain exceeds a certain limit due to the cerebral edema, rapid increase in tissue pressure and intra-cranial pressure results. Thus, brain damage worsens, and thereafter, the extent of the infarcted area is fixed
10 (Inamura, K., Terashi, A. "Nippon Rinsho, Dai 51 Kan, CT, MRI Jidai no No-Sotchu Gaku, Jo-Kan (Nippon Rinsho, Vol. 51, Cerebral Apoplexy in the Age of CT and MRI, No. 1)" Nippon Rinsho, p231-239 (1993)). When an infarction occurs in a section of the brain, those functions carried by the affected part, such as cognition, perception, sense, and memory,
15 are lost.

To date, nerve cells have been clinically recognized as being vulnerable to ischemia. Certain types of nerve cells are damaged when placed under ischemic conditions for only a few minutes, and these cells subsequently die. In hippocampal formations and pyramidal cells under
20 ischemic conditions, a conduction block occurs after significant nerve excitation associated with depolarization. Subsequently, cell functions are lost due to the cytotoxicity caused by increased levels of extracellular glutamic acid, intracellular calcium ion, free radicals, and such, and the cells eventually die. If the irreversible
25 changes caused by ischemia can be appropriately treated in an acute stage, it is thought that mortality rates can be improved, and aftereffects alleviated. Current treatment for cerebral infarction involves administering antiplatelet agents, agents for improving cerebral circulation and metabolism, and such. Among these antiplatelet agents,
30 pharmaceutical agents effective for treating acute stage cerebral thrombosis exist. However, since these agents promote hemorrhagic cerebral infarction in patients suffering from cerebral hemorrhages or cerebral infarctions that develop symptoms similar to cerebral

thrombosis, their use in these patients is contraindicated, and the disease type must be carefully diagnosed when using such agents.

During the acute stage, the use of agents for improving cerebral circulation used for administration during the chronic stage, which is approximately one month after the cerebral infarction attack, is considered unfavorable (Kameyama, M. Ed. "Nou-sotchu Chiryō Manyūaru (Treatment Manual of Cerebral Apoplexy)" Igaku-Shoin, p172-173 (1991)). Reperfusion therapy such as thrombolytic therapy, bypass surgery, thrombendarterectomy, and embolectomy are used as alternative methods of treatment during the hyperacute stage, in order to re-establish blood flow to regions where cells have not yet died. However, when the brain tissue is already irreversibly damaged by the cerebral infarction, the subsequent re-establishment of blood flow is problematic due to the danger of aggravating tissue injury, such as increasing the hemorrhagic infarction and cerebral edema (Okada, Y., "Shinkei Kenkyū no Shinpo (Progress in Neurologic Research)" Vol. 40, No. 4, p. 655-665, Igaku-Shoin, (1996); Takahashi, A. "medicina" Vol. 32, No. 11, p. 2261-2263, Igaku-Shoin, (1991)).

At present, the pharmaceutical agents used in the acute stages of cerebral infarctions are risky in that they may cause hemorrhagic infarctions and ischemic/reperfusion injuries. Furthermore, these agents are not completely satisfactory due to other problems such as the limited pathogenic conditions targeted, and the limited period over which administration is expected to be therapeutically effective.

Disclosure of the Invention

An objective of the present invention is to provide pharmaceutical agents that can reduce the degree of brain injury caused by cerebral ischemic/reperfusion injuries associated with reperfusion after blood flow to the brain has been cut off. The HGF gene differs from other angiogenesis factors, such as VEGF, in that it does not increase the permeability of newly produced blood vessels. In cerebrovascular disorders in particular, increased vascular permeability increases the

danger of injury to cerebral tissues by cerebral edema and increased intracerebral pressure. Thus, therapeutic and preventive methods using HGF that do not increase vascular permeability, are advantageous compared to methods using other angiogenesis factors.

5 An objective of the present invention is to provide therapeutic or preventive agents that use an HGF gene, against cerebrovascular disorders, and to provide methods of treating and preventing cerebrovascular disorders using these pharmaceutical agents. More specifically, the present invention is summarized as follows.

- 10 (1) An agent for treating or preventing a cerebrovascular disorder, wherein the agent comprises an HGF gene.
- (2) The agent of (1), wherein the cerebrovascular disorder is a cerebral infarction.
- (3) The agent of (1) or (2), wherein the agent is in the form of a tablet,
15 pill, sugar-coated tablet, capsule, liquid, gel, ointment, syrup, slurry, or suspension.
- (4) The agent of any one of (1) to (3), wherein the agent is used to transfer a gene into a cell by a method employing a viral envelope vector,
internal type liposome, electrostatic type liposome, HVJ-liposome, or
20 improved HVJ-liposome, a receptor-mediated gene transfer method, a method for transferring a nucleic acid molecule along with a carrier into a cell by using a particle gun, a direct introduction method using a naked-DNA, or an introduction method using a cationic polymer.
- (5) The agent of any one of (1) to (3), wherein the agent is used to
25 transfer a gene into a cell by employing an HVJ-envelope.
- (6) A method for treating or preventing a cerebrovascular disorder, wherein the method comprises the step of introducing an HGF gene into a mammal.
- (7) The method of (6), wherein the cerebrovascular disorder is a cerebral
30 infarction.
- (8) The method of (6) or (7), wherein the method comprises the step of introducing an HGF gene into a mammal two to three times by employing an HVJ-envelope.

(9) Use of an HGF gene to produce an agent for treating or preventing a cerebrovascular disorder.

(10) The use of the HGF gene of (9), wherein the cerebrovascular disorder is a cerebral infarction.

5 The term "HGF gene" as used in this invention refers to a nucleic acid molecule that can express an HGF (an HGF protein). Herein, the term "nucleic acid molecule" refers to molecules such as DNAs, RNAs, cDNAs, and mRNAs. Specifically, cDNAs that encode HGF are described in, for example, Nature 342: 440 (1989), Patent No. 2777678, and Biochem. 10 Biophys. Res. Commun. 163: 967 (1989). The nucleotide sequences of cDNAs encoding HGF are described in the aforementioned literature, and are also registered in databases such as GenBank. Based on this sequence information, cDNAs of HGF can be cloned by using appropriate sequence segments as PCR primers, and by performing RT-PCR using, for example, 15 mRNAs derived from the liver or leukocytes. One skilled in the art can readily perform such cloning by following fundamental texts, such as Molecular Cloning 2nd edition (Cold Spring Harbor Laboratory Press) (1989). Furthermore, by screening genomic DNA libraries, genomic DNAs can be isolated.

20 The HGF genes of this invention are not limited to these cDNAs and genomic DNAs. As long as a gene encodes a protein that, when expressed, has practically the same function as HGF, the gene can be used as an HGF gene of this invention. More specifically, the HGF genes that can be used in this invention encompass 1) nucleic acids that 25 hybridize under stringent conditions with an aforementioned cDNA, or 2) nucleic acids encoding proteins that comprise an amino acid sequence of a protein encoded by an aforementioned cDNA, in which one or more (preferably several) amino acids are deleted, substituted, added, and/or inserted, so long as the proteins encoded by such nucleic acids 30 have a function of HGF. The nucleic acids of the aforementioned 1) and 2) can be readily obtained by methods such as site-directed mutagenesis, PCR methods (see, Current Protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) John Wiley & Sons, Sections 6.1-6.4), or conventional

hybridization methods (see, Current Protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) John Wiley & Sons, Sections 6.3-6.4).

More specifically, by using a known sequence of an HGF gene, or a portion thereof as a probe; or by using an oligonucleotide that specifically hybridizes with that DNA sequence as a primer, those skilled in the art can isolate nucleic acids that hybridize with that DNA sequence. Stringent hybridization conditions for obtaining nucleic acids that encode proteins functionally equivalent to known HGF are normally "1x SSC at 37°C" and such, more stringently "0.5x SSC and 0.1% SDS at 42°C" and such, and even more stringently "0.1x SSC and 0.1% SDS at 65°C" and such. When more stringent hybridization conditions are used, nucleic acids comprising sequences more homologous to the probe sequence can be isolated. However, the SSC, SDS, and temperature conditions recited herein are only examples. One skilled in the art can readily set conditions that constitute the same degree of stringency as the above-described, by considering the above-mentioned conditions and other conditions that determine the stringency of hybridization, such as probe concentration, probe length, and reaction time.

The amino acid sequences of the proteins encoded by the nucleic acids isolated by the above-mentioned hybridization methods or PCR methods usually show high homology to conventionally known HGF proteins. The term "high homology" refers to a sequence homology of at least 50% or more, more preferably 70% or more, even more preferably 90% or more (for example, 95% or more). The sequence identity of amino acid sequences and nucleotide sequences can be determined using Karlin and Altschul's BLAST algorithm (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5877 (1993)). Programs such as BLASTN and BLASTX have been developed based on this algorithm (Altschul et al. J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990)). When nucleotide sequences are analyzed using BLASTN, based on BLAST, parameters are set, for example, at score = 100 and wordlength = 12. When amino acid sequences are analyzed by using BLASTX, based on BLAST, parameters are set, for example, at score = 50 and wordlength = 3. When using the BLAST and Gapped BLAST programs, the default parameters for

the respective programs are used. Specific techniques for these analytical methods are well known (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

As described above, the HGF genes used in this invention can be naturally occurring or artificial nucleic acids, as long as the proteins encoded by the genes comprise HGF activity. HGF has the activity of promoting the *in vitro* proliferation of hepatic parenchymal cells. Therefore, it is possible to determine whether the proteins encoded by the nucleic acids obtained by the above-described hybridization methods or such, or the proteins encoded by the nucleic acids of a modified naturally occurring HGF gene, have HGF activity, by, for example, investigating the effect of these proteins on the *in vitro* proliferation of hepatic parenchymal cells.

The gene transfer methods, transfer forms, transfer amounts, and such used in the gene therapies of this invention are described below.

Methods for administering gene therapy agents comprising an HGF gene as an active ingredient can be classified into two groups: methods using non-viral vectors; and methods using viral vectors. The preparation methods, administration methods, and such for these vectors are described in detail in experiment manuals (Jikken Igaku (Experimental Medicine) Supplementary Volume, "Idenshichiryo no Kisogijyutsu (Fundamental Techniques for Gene Therapy)", Yodosha, 1996; Jikken Igaku (Experimental Medicine) Supplementary Volume, "Idenshidonyu & Hatsugenkaiseki Jikkenho (Experimental Methods for Gene Transfer & Expression Analysis)", Yodosha, 1997; "Idenshi-chiryo Kaihatsu Kenkyu Handbook (Handbook of Gene Therapy Research and Development)", Nihon Idenshichiryo Gakkai (The Japan Society of Gene Therapy) Edition, NTS, 1999). Such vectors and methods are specifically described below.

A recombinant vector, where a target gene has been inserted into a conventional non-viral gene expression vector, can be used to introduce a target gene into cells and tissues by the methods shown below.

Examples of methods for transferring genes into cells are: lipofection methods, calcium-phosphate co-precipitation methods,

DEAE-dextran methods, methods of direct infusion of DNA using a glass capillary tube, etc. Methods for transferring genes into tissues include methods using virus envelope vectors, internal type liposomes, electrostatic type liposomes, HVJ-liposomes, improved type HVJ-liposomes (HVJ-AVE liposomes), receptor-mediated gene transfer methods, methods for transferring carriers (such as metal particles) along with DNAs using particle guns, methods for directly introducing naked-DNAs, introduction methods using positively charged polymers, etc.

The aforementioned HVJ-liposomes are constructed by incorporating a DNA into a liposome formed by a lipid bilayer, then fusing this liposome with an inactivated Sendai virus (hemagglutinating virus of Japan; HVJ). The use of HVJ-liposomes is characterized by extremely high cell membrane fusion compared to conventional liposome methods, and is one of the especially preferred forms of introduction. Methods for preparing HVJ-liposomes are described in detail in, for example, Experimental Medicine Supplementary Volume, "Idenshichiryō no Kisogijyutsu (Fundamental Techniques of Gene Therapy)", Yodosha, 1996; Experimental Medicine Supplementary Volume, "Idenshidonyū & Hatsugenkaiseki Jikkenho (Experimental Methods for Gene Transfer & Expression Analysis)", Yodosha (1997); J. Clin. Invest. 93: 1458-1464 (1994); Am. J. Physiol. 271: R1212-1220 (1996). Methods for using the HVJ-liposome are described in, for example, Molecular Medicine 30: 1440-1448 (1993); Jikken Igaku (Experimental Medicine), 12: 1822-1826 (1994); and Tanpakushitsu Kakusan Kouso (Protein, Nucleic Acid, and Enzyme), 42, 1806-1813 (1997); and preferably described in Circulation 92 (Suppl. II): 479-482 (1995).

Furthermore, methods using viral envelopes are particularly preferred methods for administering an HGF gene of this invention. Viral envelopes can be prepared by mixing a purified virus with an expression vector of interest in the presence of a surfactant, or by freezing and thawing a mixture of a virus and an expression vector (Japanese Patent Application No. 2001-026185 / JP-A 2001-286282).

The viruses that can be used in the methods using viral envelopes are viruses belonging to families such as the retrovirus, togavirus, coronavirus, flavivirus, paramyxovirus, orthomyxovirus, bunyavirus, rhabdovirus, poxvirus, herpesvirus, baculovirus, and hepadnavirus families, and are especially preferably HVJs. Herein, these viruses can be either wild-type or recombinant viruses. In particular, a recombinant HVJ reported by Hasan, M. K. et al. (J. General Virol. 78: 2813-2820 (1997)), Yonemitsu, Y. et al. (Nature Biotech. 18: 970-973 (2000)), or such may be used as an HVJ.

While the Z strain (available from ATCC) of HVJ is generally preferable for use in the methods using HVJ-liposomes or HVJ-envelopes, fundamentally, other HVJ strains (for example, ATCC VR-907 and ATCC VR-105) can also be used. In the methods for preparing a viral envelope, purified viruses can be inactivated by UV irradiation and such, and then mixed with a desired expression vector. Surfactants that may be used for mixing the virus and expression vector are, for example, octylglucoside, Triton X-100, CHAPS, and NP-40. Viral envelope vectors prepared in this manner can be introduced by injection or such into tissues to be targeted for therapy or disease prevention. Furthermore, by freezing at -20°C, the viral envelope vectors can be stored for at least two to three months.

The expression vectors that may be used herein can be any expression vectors, so long as they can express a desired gene *in vivo*. Examples of the expression vectors are pCAGGS (Gene 108: 193-200 (1991)), pBK-CMV, pcDNA3.1, and pZeoSV (Invitrogen, Stratagene).

Representative methods for gene transfer with viral vectors are those methods using viral vectors such as recombinant adenoviruses and retroviruses. More specifically, a subject gene can be transferred into cells by the steps of: introducing the gene into DNA or RNA viruses such as detoxicated retroviruses, adenoviruses, adeno-associated viruses, herpesviruses, lentiviruses, vaccinia viruses, poxviruses, polioviruses, sindbis viruses, Sendai viruses, SV40, or human immunodeficiency viruses (HIV) (see Pharmacol. Ther. 80: 35-47 (1998);

Front. Biosci. 4: E26-33 (1999); J. Recep. Signal. Transduct. Res. 19: 673-686); and then infecting cells with the resultant recombinant virus.

The infection efficiency of adenovirus vectors is much greater than the other aforementioned viral vectors. Thus, from this viewpoint, the use of an adenovirus vector system is preferred.

Methods for introducing an agent of the present invention during gene therapy include: the *in vivo* introduction of a gene therapy agent directly into the body; and the *ex vivo* introduction of a gene therapy agent into a cell harvested from the body, followed by reintroduction of the modified cell into the body (Nikkei Science, April 1994, 20-45; Gekkan Yakuji 36 (1), 23-48, 1994; Jikken Igaku (Experimental Medicine) Supplementary Volume, 12 (15), 1994; "Idenshi-chiryō Kaihatsu Kenkyū Handbook (Handbook of Gene Therapy Research and Development)", Nihon Idenshichiryō Gakkai eds. (The Japan Society of Gene Therapy) Edition, NTS, 1999). *In vivo* methods are particularly preferred in the present invention.

Various formulations, (for example, liquid preparations), suited to each of the above-mentioned administration methods may be adopted as the form of the preparations. For example, an injection comprising a gene as an active ingredient can be prepared by conventional methods, which might include dissolving a gene in an appropriate solvent (e.g. a buffer solution, such as PBS, physiological saline, and sterilized water), sterilizing by filtration as necessary, and then loading into a sterile container. Conventional carriers or such may be added to injection agents as required. Alternatively, liposome preparations, such as preparations comprising HVJ-liposome, can be prepared as suspensions, frozen agents, or centrifugally concentrated frozen agents.

For the therapeutic or preventive agents of this invention, an HGF gene can be used as the single active ingredient, and can also be used together with other known factors having angiogenic functions. For example, factors such as VEGF and EGF have been reported to possess angiogenic functions, thus genes encoding these factors may be

concurrently applied. Furthermore, since growth factors such as EGF have been reported to repair cell lesions in various tissues, genes encoding a variety of growth factors may be concurrently used as necessary. From the description of the present invention, it is clear to those skilled in the art that the following agents can be used, as required, in combination with the HGF gene in the therapeutic or preventive agents of the present invention: other pharmaceutical agents having therapeutic or preventive effects against a cerebrovascular disorder to be treated or prevented; and substances that stabilize or enhance HGF (for example, heparin-like substances (JP-A Hei 10-158190) and oligosaccharides (JP-A Hei 5-301824)). If these additional pharmaceutical agents and substances are encoded by genes, the genes encoding them may be administered together with the HGF gene in the therapeutic or preventive agents of this invention.

Appropriate administration methods and sites to be administered can be selected for the therapeutic and preventive agents of the present invention depending on the disorders, symptoms, or such to be treated. Parenteral administration is particularly preferred. The cisterna magna and lumbar spine are especially preferable administration sites. The cisterna magna or lumbar spine is punctured into the meningeal, and then an appropriate amount of spinal fluid is collected to confirm the puncture site, and to prevent an increase in intracranial pressure. The therapeutic or preventive agent is then administered. For example, a method for administering HVJ-liposome complex using a cannula, reported by Hayashi, K. et al. (Gene Therapy 8: 1167-73 (2001)), could be applied to administer the therapeutic or preventive agents of this invention into the cisterna magna.

The effect of the therapeutic or preventive agents of this invention is considered to be caused by using HGF gene administration to sustain neurons by suppressing apoptosis in the so-called "penumbra" region around the focus of the cerebral infarction. Therefore, "therapy" in the present invention means treatment to reduce the effect of a blood flow disorder after it occurs in the brain.

More specifically, a therapeutic effect of the pharmaceutical agents or methods of this invention refers to an effect whereby the administration of a pharmaceutical agent or the application of a method of this invention, after the onset of cerebrovascular disorder, reduces
5 brain tissue damage caused by the cerebrovascular disorder, compared to when nothing is administered. Therefore, "therapy" in the present invention encompasses not only complete recovery from the damage, but also the effect of reducing the degree of damage.

On the other hand, "prevention" in the present invention refers
10 to a reduction in the effect of a blood flow disorder, by the preventative administration of an HGF gene prior to the blood flow disorder occurring in the brain. More specifically, HGF gene administration is said to have a preventive effect when the administration of an HGF gene prior to the onset of a cerebrovascular disorder, such as a cerebral infarction,
15 reduces the brain tissue damage caused by the cerebrovascular disorder that occurs after administration, compared to when nothing is administered. Therefore, "prevention" in the present invention encompasses not only complete recovery from the damage, but also the effect of reducing the degree of damage.

20 The terms "therapeutic agent" and "preventive agent" of this invention are used as terms that mean pharmaceutical formulations comprising the above-mentioned functions. The therapeutic methods and preventive methods of this invention are methods comprising the step of administering a pharmaceutical formulation comprising an
25 above-mentioned effect.

On the other hand, cerebrovascular disorders in this invention refer to conditions in which blood flow to the brain is inhibited. Disorders that cause inhibition of blood flow to the brain are, for example, cerebral infarctions and intracerebral hemorrhages.
30 Inhibited blood flow is not limited to that caused by disease. For example, conditions of reduced blood flow resulting from a blood vessel artificially sealed off in surgical treatment, and from an injured blood vessel due to a wound, are included in the cerebrovascular disorders

of this invention. The cerebrovascular disorders of this invention include, for example, cerebrovascular disorders that cause ischemic or infarcted lesions in the cerebral parenchyma, such as a cerebral infarction (cerebral thrombosis, cerebral embolism, and the like), intracerebral hemorrhage, subarachnoid hemorrhage, hypertensive encephalopathy, cerebrovascular dementia, and Alzheimer-type dementia.

5 The therapeutic or preventive agents of the present invention comprise a sufficient amount of HGF gene to accomplish the objective intended by the pharmaceutical agent. In other words, the agents of the present invention comprise an HGF gene in a "therapeutically effective amount" or a "pharmacologically effective amount". The terms "therapeutically effective amount" and "pharmacologically effective amount" are effective amounts of pharmaceutical agent to produce the intended pharmacological results, and sufficient amounts to relieve the symptoms of the patient to be treated. Assays useful in confirming an effective dose for a particular application are, for example, methods for measuring the degree of recovery from a target disease. The amount that should actually be administered varies depending on the age, weight, and symptom of the patient being treated, as well as on the administration method and such, and is preferably an amount optimized to achieve a desired effect without marked side effects.

15 Therapeutically effective amounts, pharmacologically effective amounts, and toxicity can be determined by cell culture assays or optionally, by using appropriate animal models. Such animal models can be used to determine the desired concentration range and administration route for a pharmaceutical agent. Based on these animal models, one skilled in the art can determine the effective dose for a human. The dose ratio of therapeutic effect to toxic effect is called the "therapeutic index", and this can be expressed as the ratio: ED50/LD50.

25 Pharmaceutical compositions with a large therapeutic index are preferred. An appropriate dose is selected according to the dosage form, the patient's sensitivity, age, and other conditions, and the type and severity of the disease. Although the dose of a therapeutic agent of

30

the present invention differs depending on the condition of the patient, the adult dose of an HGF gene is in the range of approximately 1 μ g to approximately 50 mg, preferably in the range of approximately 10 μ g to approximately 5 mg, and more preferably in the range of approximately 50 μ g to approximately 5 mg. In particular, since an HGF gene can be repeatedly administered by an HVJ envelope method, administration of the HGF gene can be performed not only once, but many times, such as two or three times, to obtain better therapeutic or preventive effects. Such multiple administrations using an HVJ envelope are also included in the therapeutic or preventive methods of this invention.

Brief Description of the Drawings

Fig. 1 is a set of photographs of the TTC-stained coronal slices of rats (three out of six animals) belonging to the physiological saline group.

Fig. 2 is a set of photographs of the TTC-stained coronal slices of rats (three out of six animals) belonging to the pVAXI group.

Fig. 3 is a set of photographs of the TTC-stained coronal sections of rats (three out of six animals) belonging to the HGF group.

Fig. 4 is a graph comparing the areas of the infarcted areas in the physiological saline group, the pVAXI group, and the HGF group. A schematic diagram of the rat brain is shown above right. The coronal sections were prepared by slicing the brains along the lines indicated as 1 to 5. The numbers 1 to 5 in the schematic diagram correspond to those on the horizontal axis. The vertical axis indicates the percentage (%) of the total coronal slice area that is occupied by the infarcted area.

Best Mode for Carrying out the Invention

Hereinafter, the present invention will be specifically illustrated with reference to Examples, but is not to be construed as being limited thereto.

(1) Production of HGF gene expression vector

Human HGF cDNA (2.2 kb) was inserted between the BamHI and NotI sites of the pVAX1 vector (Invitrogen).

5 (2) Preparation of the HVJ-envelope

Immediately prior to its use, the purified Sendai virus (HVJ) (Z strain) was inactivated by UV irradiation (99 mJ/cm²). Next, the inactivated HVJ (15,000 hemagglutination units (HAU)) and the vector produced in (1), or an expression vector not comprising HGF cDNA, were
10 mixed with 0.3% Triton X-100 solution at 4°C. This mixture was centrifuged for 15 minutes at 4°C. After removing the supernatant, buffering salt solution was added to the residue and then centrifuged for another 15 minutes at 4°C. After removing the supernatant, the
15 pellet was suspended in 100 µL of phosphate-buffered saline, and used to investigate the effect on cerebral infarction.

(3) Administration of HVJ envelope-DNA complex to a rat right middle cerebral artery occlusion model

Wistar rats weighing 250 to 270 g were anesthetized with halothane
20 (4% at the time of introduction; maintained at 1%). Animals were then cisternally administered, using a 26 G needle, with: 1) physiological saline (100 µL) for the physiological saline group; 2) pVAXI (400 µg)/HVJ-E (15,000 HAU) (100 µL) for the pVAXI group, comprising vectors only; and 3) pVAXI-HGF (400 µg)/HVJ-E (15,000 HAU) (100 µL) for the
25 HGF-administered group. Six animals were used in each group. Three days after administration, 21 mm of 4-0 nylon suture coated with poly-L-lysine was inserted from the right external carotid artery into the right internal carotid artery under halothane anesthesia, to produce a right middle cerebral artery occlusion model. During this treatment,
30 the body temperatures of the animals were maintained at around 37°C using a heating pad, and their blood pressures were measured at the caudal artery. Neurological evaluation was carried out one hour and 24 hours after this treatment. Neurological evaluation was performed according

to the standard shown below, and the total scores of each group were compared (denoted in Table 1 as the Neurological Severity Score (NSS)). The results were statistically analyzed using a Mann-Whitney U test with StadtView 5.0J.

- 5
- 1) Presence of flexion of the left foreleg
 - 0 Not flexed
 - 0.5 Slightly flexed
 - 1 Completely flexed
 - 10 2) Resistance against lateral compression
 - 0 Same degree of resistance to the right and left
 - 0.5 Slightly weakened resistance
 - 1 No resistance
 - 15 3) Body Posture
 - 0 Normal
 - 0.5 Slightly bent to the left
 - 1 Completely bent to the left
 - 20 4) Position of the left foreleg
 - 0 Quickly returns to original position
 - 0.5 Returns to original position
 - 1 Does not return to original position
 - 25 5) Position of the right foreleg
 - 0 Quickly returns to original position
 - 0.5 Returns to original position
 - 1 Does not return to original position

Table 1

| | HGF/HVJ | pVAXI/HVJ | Physiological saline | p-Value |
|--|-----------------|----------------|----------------------|---------|
| Body weight | 250.4 \pm 2.0 | 253 \pm 2.3 | 251.8 \pm 2.4 | |
| Blood pressure (before treatment) | 88.6 \pm 1.9 | 88.8 \pm 3.7 | 88.5 \pm 2.1 | |
| Blood pressure (after treatment) | 82.4 \pm 1.7 | 81.2 \pm 3.8 | 82.8 \pm 1.4 | |
| Body temperature (before treatment) | 37.4 \pm 0.1 | 37.3 \pm 0.1 | 37.2 \pm 0.2 | |
| Body temperature (after treatment) | 37.6 \pm 0.1 | 37.1 \pm 0.2 | 37.4 \pm 0.2 | |
| NSS (1 hr) | 1.0 \pm 0.2 | 1.3 \pm 0.4 | 1.4 \pm 0.2 | p<0.05* |
| NSS (24 hr) | 1.0 \pm 0.1 | 1.4 \pm 0.2 | 1.3 \pm 0.3 | p<0.05* |

*Compared to the physiological saline group using a Mann-Whitney U test.

As shown in Table 1, differences in blood pressure and body temperature during the operation were not observed between the physiological saline group, pVAXI group, and HGF group. The score for neurological evaluation was significantly lower for the HGF group than the other two groups, suggesting that administration of the HGF gene maintains neurological function.

The animals were sacrificed 24 hours later, and coronal sections were prepared every 2 mm from the frontal pole (at the positions indicated by lines 1 to 5 in the schematic diagram to the top right of Fig. 4). TTC staining was performed, and the areas of the infarcted areas were compared (Figs. 1 to 3). To compare these areas, the numbers of pixels occupied by the infarcted areas were measured using Adobe Photoshop 5.0. The effect of the edema was taken into consideration, and evaluations were made according to the following formula: (the lateral area of a healthy brain - (the lateral area of an infarcted brain - area of infarcted area))/the lateral area of a healthy brain x 100 (%). Fig.

4 shows the results. The proportion of the infarcted area compared to the total area of the coronal section is indicated as a percentage. As is apparent from Figs. 1 to 4, the infarcted area in the HGF gene transfected group was confirmed to be reduced.

5

Industrial Applicability

The above-mentioned results confirmed that the administration of an HGF gene shows advantageous effects, maintains neuronal function, and reduces the size of an infarcted area in the early stages of cerebrovascular disorders, such as cerebral infarctions. More specifically, HGF was shown to probably play a role in regulating cerebrovascular disorders. The present invention provides novel methods for treating cerebrovascular disorders, including cerebral infarctions, where the methods involve overexpressing HGF by introducing an HGF gene. The present methods utilizing HGF gene enable active treatment of cerebrovascular disorders, including cerebral infarction, by gene transfer. The present methods also enable maintenance of neuronal function and inhibition of the infarcted area in patients for whom appropriate treatment methods did not exist until now.

CLAIMS

1. An agent for treating or preventing a cerebrovascular disorder, wherein the agent comprises an HGF gene.
5
2. The agent of claim 1, wherein the cerebrovascular disorder is a cerebral infarction.
3. The agent of claim 1 or 2, wherein the agent is in the form of a
10 tablet, pill, sugar-coated tablet, capsule, liquid, gel, ointment, syrup, slurry, or suspension.
4. The agent of any one of claims 1 to 3, wherein the agent is used
15 to transfer a gene into a cell by a method employing a viral envelope vector, internal type liposome, electrostatic type liposome, HVJ-liposome, or improved HVJ-liposome, a receptor-mediated gene transfer method, a method for transferring a nucleic acid molecule along
20 with a carrier into a cell by using a particle gun, a direct introduction method using a naked-DNA, or an introduction method using a cationic polymer.
5. The agent of any one of claims 1 to 3, wherein the agent is used to transfer a gene into a cell by employing an HVJ-envelope.
- 25 6. A method for treating or preventing a cerebrovascular disorder, wherein the method comprises the step of introducing an HGF gene into a mammal.
7. The method of claim 6, wherein the cerebrovascular disorder is a
30 cerebral infarction.
8. The method of claim 6 or 7, wherein the method comprises the step of introducing an HGF gene into a mammal two to three times by employing

an HVJ-envelope.

9. Use of an HGF gene to produce an agent for treating or preventing a cerebrovascular disorder.

5

10. The use of the HGF gene of claim 9, wherein the cerebrovascular disorder is a cerebral infarction.

ABSTRACT

The present invention provides novel methods for treating cerebrovascular disorders, in which HGF is overexpressed by introducing an HGF gene. The methods of this invention using an HGF gene enable active treatment of cerebrovascular disorders, such as cerebral infarction, by gene transfer, and enable the maintenance of neuronal function and the suppression of infarcted areas in patients for whom appropriate treatment methods were unavailable until now.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.